

非洲猪瘟病毒荧光 PCR 检测试剂盒说明书

批准文号：兽药临字 154028864

兽用

【兽药名称】

通用名 非洲猪瘟病毒荧光 PCR 检测试剂盒
商品名 无
英文名 African Swine Fever Virus Real-time PCR Detection Kit
汉语拼音 Feizhouzhuwenbingdu Yingguang PCR Jianceshijihe

【主要成分与含量】

组份	规格
荧光 PCR 酶混合液	1000 μ l/管 \times 1 管
引物探针	1 管
阳性对照	500 μ l/管 \times 1 管
阴性对照	500 μ l/管 \times 1管
说明书	1份

【作用与用途】 用于全血、血清、淋巴结、脾脏、肾脏、扁桃体、肺、肌肉、环境样品等样品中非洲猪瘟病毒核酸的检测。

【用法与判定】

1 用法

1.1 样品采集及处理

1.1.1 活猪样品 无菌采集抗凝血或血清 5 ml。

1.1.2 病死猪剖检样品或屠宰场剖检样品 无菌采集死猪的脾、肺、肾、扁桃体、淋巴结、肌肉等组织样品。2~8 $^{\circ}$ C低温运至实验室用于检测。

1.1.3 病猪污染的周边环境 采集与病猪相关场所的粪便、饲料、污水样品。2~8 $^{\circ}$ C低温运至实验室用于检测。

1.2 样品处理方法

1.2.1 脾、肺、肾等组织样品处理方法 取适当大小的组织块放入盛有 PBS 缓冲液的研磨管中，6000 r/min 震荡研磨 45 秒，制成约 10%的组织匀浆液，5000 r/min 离心 5 分钟，取 200 μ l 上清液进行核酸提取。

1.2.2 粪便、饲料样品处理方法 取适量的粪便、饲料放入盛有 PBS 缓冲液的研磨管中，6000 r/min 震荡研磨 45 秒，制成约 10%的匀浆液，5000 r/min 离心 5 分钟，取 200 μ l 上清液

进行核酸提取。

1.2.3 污水样品处理方法 直接取 200 μl 污水进行核酸提取。

1.3 样品核酸提取 采用 DNA 提取试剂盒或自动核酸提取仪提取各类样品中的核酸。低温保存待检。

1.4 PCR 扩增 将试剂盒置室温使荧光 PCR 酶混合液、引物探针、阴性对照和阳性对照完全溶解，并混匀。

1.4.1 将引物探针（棕色管）和荧光 PCR 酶混合液瞬时离心后，将荧光 PCR 酶混合液全部移至引物探针（棕色管）中，颠倒混匀 6 次，充分混匀，配制成 PCR 反应液。

1.4.2 取 18 μl PCR 反应液至每个反应管内，然后加 2 μl 所提取的样品核酸，每个反应总体积为 20 μl 。每次检测应设立阳性对照和阴性对照。在荧光 PCR 仪上进行扩增检测。

1.5 反应程序

37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 分钟，95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 分钟；95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 秒，58 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 1 分钟，45 个循环，在每一循环的 58 $^{\circ}\text{C}$ 时收集 FAM 荧光信号。

2 结果判定

2.1 阳性对照的 Ct 值应 < 35 且出现特异性扩增曲线，阴性对照应无 Ct 值或 Ct 值 ≥ 40 且无特异性扩增曲线，试验结果有效；否则应重新进行试验。

2.2 被检样品 Ct 值 < 40 且出现特异性扩增曲线，判为阳性；当无 Ct 值或 Ct 值 ≥ 40 ，判为阴性。

【注意事项】 （1）PCR 检测的每一步都应在专门区域或地点进行。

（2）使用前应将荧光 PCR 酶混合液、引物探针、阴性对照和阳性对照完全溶化，充分振荡混匀，瞬时离心，尽量吸取液体上层。

（3）试剂盒不同组分间不得交叉，防止污染。

（4）避免反复冻融。

（5）PCR 产物均应合理处理，以免造成污染。

（6）严格按照使用说明书进行操作。

（7）按要求贮藏，冷链运输；并在有效期内使用。

【规格】 50 次/盒

【贮藏与有效期】 -20 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期为 15 个月。

仅供兽医诊断使用
